

令和元年6月14日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26710015

研究課題名(和文)全ゲノム操作が拓く難培養細菌の遺伝子工学

研究課題名(英文)Genetic modification of unculturable bacteria by whole genome manipulation

研究代表者

柿澤 茂行(Kakizawa, Shigeyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：10588669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：スピロプラズマという細菌の全ゲノムをクローニングするため、まずゲノムを rare-cutter の制限酵素によって切断し、バンドパターンをパルスフィールドゲル電気泳動によって確認した。次にこれらの切断断片を TAR cloning 法を用いて酵母細胞内にクローニングした。得られたクローンを Junction PCR、Multiplex-PCR、パルスフィールドゲル電気泳動などの手法によって確認し、多数のポジティブクローンを得た。ポジティブクローンのインサートの全塩基配列を次世代シーケンス解析により解読した結果、塩基配列の変異はほとんど認められず、正しい配列がクローニングできていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難培養細菌(難培養性細菌・未培養細菌)と呼ばれる細菌は、培養が不可能もしくは非常に困難な細菌である。難培養細菌は決して珍しいものではなく、環境中の微生物の99%以上は培養できないことが明らかとなっている。細菌のゲノムを自在に改変する技術はいくつか報告されているが、難培養細菌に応用できるものは限られている。本研究では細菌ゲノムを丸ごとクローニングして配列を改変することで、難培養細菌の遺伝子を改変することを旨とし、そのための全ゲノムクローニングを行った。得られた結果は、今後の細菌ゲノム研究の発展に寄与すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Toward cloning of whole genome of a bacterium, Spiroplasma, whole genome of this bacterium was extracted and cut by the rare-cutter restriction enzymes. Then patterns of genome fragments were analyzed by pulse-field gel electrophoresis. These genomic fragments were used for the TAR (Transformation-Associated Recombination)-cloning in yeast cells. Lots of positive clones were obtained, and these clones were checked by several methods. Whole sequences of the insert of several positive clones were analyzed by the Illumina sequencing method. As a result, there was almost no mutation in these inserts, thus this method would be useful for cloning of bacterial genomes.

研究分野：細菌ゲノム学

キーワード：細菌 ゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難培養細菌（難培養性細菌・未培養細菌）と呼ばれる細菌は、培養が不可能もしくは非常に困難な細菌である。難培養細菌は決して珍しいものではなく、近年のメタゲノム解析などの台頭により、環境中の微生物の99%以上は培養できないことが明らかとなり、これにより新たな微生物像が浮き彫りとなった。これらの難培養細菌は、その全ゲノム配列を決めることで多くの知見が得られる一方で、遺伝子のノックアウトや過剰発現ができないという技術的な欠陥のため、その遺伝子の機能についての確実な証明はほとんどされていないのが現状である。

加えて近年、合成生物学の分野において、細菌のゲノムを大規模に再構成する手法が開発された。マイコプラズマという細菌を用いた例を挙げると、メガベース単位のゲノムを出芽酵母の細胞内において組み上げる手法(1)、溶液中で数百キロベースのDNAをアッセンブルする手法(2)、細菌の環状ゲノムを異種の細菌の細胞へとゲノム移植する手法などが開発されている(3-6)。これらの新手法は、全ゲノムレベルのDNAを操作・改変する上で画期的かつ利用価値の高いものであり、細菌の研究を大きく進展させ、新たな知見を加速度的に生み出す手法として期待される。これらの研究の中で、「ゲノム移植によってドナー細菌の性質をレシピエント細菌へと完全に付与できる」という興味深い知見が得られている(図1)。具体的には、ドナー細菌の増殖速度・コロニー形状・タンパク質の発現様式・膜タンパク質のレパートリーなどのすべての性質がレシピエント細菌へと付与され、移植後の細菌はドナー細菌とまったく区別がつかなくなった(6)。この知見は、細菌が持つ多くの性質を、ゲノム移植によりすべて付与できるという好例である。

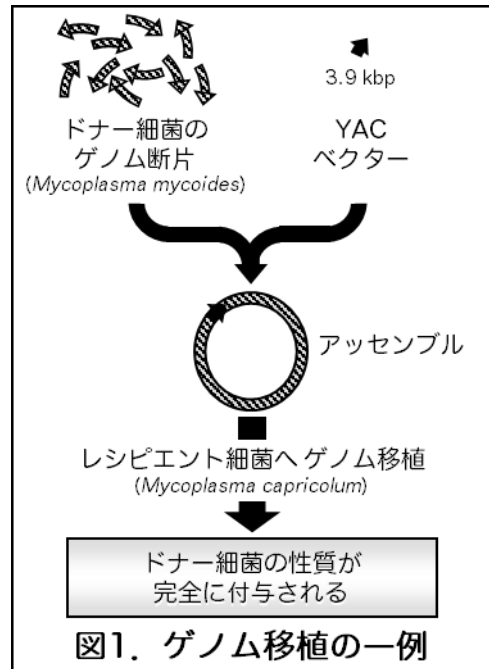


図1. ゲノム移植の一例

2. 研究の目的

本研究は、近年開発された「全ゲノム操作技術」を応用することで、難培養細菌のゲノムクローニングおよびその操作を行うことで、その遺伝子操作系の開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

1 メガ bp 超のゲノムをクローニングするための酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome: YAC) ベクターはすでに米国のベンター研究所において開発されているため、これを用いる(3)。クローニング対象とする菌株は、ファイトプラズマとスピロプラズマを用いる。これらの全ゲノムはすでに解読されている。これらの難培養細菌を選んだ主な理由は、非常に興味深い生命現象を司るため、それらの解明が期待される点であり、加えてこれらのゲノムサイズが小さいこと（すべて 1 Mbp 以下）も理由の1つである。

クローニングには TAR (Transformation-Associated Recombination) cloning という手法を用いるため(7)、量の少ない難培養細菌ゲノムでも十分にクローニング可能である。クローニングの確認には、Junction PCR, Multiplex-PCR(8)、パルスフィールドゲル電気泳動 (Pulse-Field Gel Electrophoresis) 等を用いた。得られたクローンの塩基配列の解読には、Illumina 社による次世代シーケンスを用いた。その後、酵母内における塩基配列の改変技術である TREC(9)、TREC-In(10)、CRISPR/Cas9(11)を用いてベクター領域の改変を行った。

4. 研究成果

(1) クローニング

スピロプラズマの全ゲノムをクローニングするため、まずゲノムを rare-cutter の制限酵素である *SfiI*, *I-CeuI*, *AscI* 等によって切断し、バンドパターンをパルスフィールドゲル電気泳動によって確認した。次に、これらの切断断片を TAR cloning 法を用いて酵母細胞内にクローニングした。インサートのサイズは、218, 153, 406, 346, 1,123 kbp の 5 パターンである。すべての断片についてポジティブなクローンが得られた。

(2) クローンの選抜

次にこれらのクローンを選抜すべく、まず Junction PCR を行った。Junction PCR とは、インサートとベクター間の領域を増幅する PCR を酵母のコロニーに対して行うことで、簡便に陽性クローンを調べる手法である。その結果、ほとんどのコロニーに狙ったインサートが入っていることが確認された。次にこれらのクローンの確認のためマルチプレックス PCR を行い、インサート全長の有無を確認した。その後、ポジティブなクローンに対して、制限酵素処

理およびパルスフィールドゲル電気泳動を行い、インサートのサイズを確認したところ、多くのクローンにおいて正しいサイズのインサートを含むことが分かった。

(3) クローンの塩基配列の確認

次にインサートの塩基配列を解読するため、インサートを含む YAC を抽出し、次世代シーケンス解析を行い、元のリファレンスゲノムへとマッピングを行った。その結果、インサートには塩基配列の変異はほとんど認められず、正しい配列がクローニングできていることが分かった。

<引用文献>

1. Gibson DG, *et al.* (2008) One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(51):20404-20409.
2. Gibson DG, *et al.* (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* 6(5):343-345.
3. Gibson DG, *et al.* (2008) Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science (New York, N.Y.)* 319(5867):1215-1220.
4. Lartigue C, *et al.* (2009) Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science (New York, N.Y.)* 325(5948):1693-1696.
5. Gibson DG, *et al.* (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science (New York, N.Y.)* 329(5987):52-56.
6. Lartigue C, *et al.* (2007) Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science (New York, N.Y.)* 317(5838):632-638.
7. Benders GA, *et al.* (2010) Cloning whole bacterial genomes in yeast. *Nucleic acids research* 38(8):2558-2569.
8. Kakizawa S & Kamagata Y (2014) A multiplex-PCR method for strain identification and detailed phylogenetic analysis of AY-group phytoplasmas. *Plant Disease* 98(3):299-305.
9. Noskov VN, Segall-Shapiro TH, & Chuang RY (2010) Tandem repeat coupled with endonuclease cleavage (TREC): a seamless modification tool for genome engineering in yeast. *Nucleic acids research* 38(8):2570-2576.
10. Chandran S, *et al.* (2014) TREC-IN: gene knock-in genetic tool for genomes cloned in yeast. *BMC genomics* 15:1180.
11. Tsarmopoulou I, *et al.* (2016) In-Yeast Engineering of a Bacterial Genome Using CRISPR/Cas9. *ACS synthetic biology* 5(1):104-109.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Kakizawa S. (2019) A Multiplex-PCR Method for Diagnosis of AY-Group Phytoplasmas. *Methods Mol Biol* 1875:143-9. 査読有
DOI: 10.1007/978-1-4939-8837-2_11.
2. Mariscal AM, Kakizawa S., Hsu JY, Tanaka K, Gonzalez-Gonzalez L, Broto A, Querol E, Lluch-Senar M, Pinero-Lambea C, Sun L, Weyman PD, Wise KS, Merryman C, Tse G, Moore AJ, Hutchison CA, 3rd, Smith HO, Tomita M, Venter JC, Glass JI, Pinol J, Suzuki Y. (2018) Tuning Gene Activity by Inducible and Targeted Regulation of Gene Expression in Minimal Bacterial Cells. *ACS Synth Biol* 7(6):1538-52. 査読有
DOI: 10.1021/acssynbio.8b00028.
3. Kakizawa S., Yoneda Y. (2015) The role of genome sequencing in phytoplasma research. *Phytopathogenic Mollicutes* 5(1):19-24. 査読有
DOI: 10.5958/2249-4677.2015.00058.4

[学会発表](計 9 件)

1. Kakizawa S. Functional analysis of the minimal genome mycoplasma. Annual Meeting of Systems and Synthetic Bacteriology. 2019.03.13. Awaji Yume-butai, Hyogo, Japan
2. Kakizawa S. Toward understanding of the Fundamentals of Life: minimal bacterium and inducible CRISPRi (生命の根幹の理解に向けたミニマムゲノム細菌におけるCRISPRiの開発). 第56回日本生物物理学会 年会, 2018.09.18. 岡山大学
3. 柿澤茂行、田中 一己、Yo Suzuki. 「ミニマムゲノム細菌の遺伝子機能解明に向けたCRISPRiによる遺伝子ノックダウン系の開発」 日本進化学会 第20回大会,

2018.08.23. 東京大学

4. Kakizawa S, Jonathan Hsu, Kazuki Tanaka, Lijie Sun, Philip D. Weyman, Kim S. Wise, Chuck Merryman, Gavin Tse, Adam J. Moore, Clyde A. Hutchison III, Hamilton O. Smith, Masaru Tomita, J. Craig Venter, John I. Glass, and Yo Suzuki. Tuning gene activity by inducible and targeted regulation of gene expression in minimal bacterial cells. 22nd Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. 2018.07.19. アメリカ・ポーツマス
5. Kakizawa S, Jonathan Hsu, Kazuki Tanaka, Lijie Sun, Philip D. Weyman, Kim S. Wise, Chuck Merryman, Gavin Tse, Adam J. Moore, Clyde A. Hutchison III, Hamilton O. Smith, Masaru Tomita, J. Craig Venter, John I. Glass, and Yo Suzuki. Inducible CRISPRi in the minimal mycoplasma. 3rd Circular of Joint Congress of The 7th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology (AOM) and The 45th Meeting of the Japanese Society of Mycoplasmaology (JSM), 2018.05.18. Shinjuku, Tokyo
6. Kakizawa S. Ecology and genetic diversity of Phytoplasma. Second International Workshop on Network Development and Information Sharing for Management of Sugarcane White Leaf Disease in Asia. 2018.02.19. Khon kaen University, Thailand
7. 柿澤茂行. 「マイコプラズマを用いた全ゲノム操作技術による難培養性細菌の機能解析」, 微生物研究の新展開 ; 生物プロセス研究部門の挑戦 ワークショップ. 2016.01.13. 東京都秋葉原
8. Kakizawa S. Whole cloning of Phytoplasma and Spiroplasma genomes in yeast. The 11th US-Japan Scientific Seminar “Molecular Contact Points in Host-Pathogen Co-evolution”. 2015.10.25. 香川県高松市
9. 柿澤茂行. 「ファイトプラズマの生態と進化」, 日本微生物生態学会第 30 回大会 (JSME2015) . 2015.10.19. 茨城県土浦市

〔図書〕(計 1 件)

1. Bertaccini A, Oshima K, Kakizawa S, Duduk B, Namba S. Dissecting the multi-faceted mechanisms that drive leafhopper host-phytoplasma specificity. In: Brown JK, editor. Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens. St Paul MN: APS Press; 2016. p. 21-8 (in 496).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

1. 馬場知哉, 柿澤茂行, 森宙史, 車兪激, 黒川顕, 大島拓. 「最小ゲノム：細胞が生きるために必要な遺伝子数はいくつ？」, Journal of Geography (2019) in press 査読有

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。